

平成30年6月13日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25253073

研究課題名(和文) てんかんの新規発症機構の解明と治療法開発

研究課題名(英文) Epilepsy mechanism investigation and therapy development

研究代表者

山川 和弘 (Yamakawa, Kazuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：30241235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：若年ミオクロニーてんかん(JME)は最も頻度の高いてんかんである。本研究において我々は、原因遺伝子として腸管細胞キナーゼをコードするICK遺伝子の同定、疾患変異が神経前駆細胞の移動を阻害すること、Ick欠損マウスがイソフルラン(吸入麻酔薬)により強直間代発作を引き起こすことなどを明らかにし報告した(Bailey et al, New Eng J Med 378:1018-28, 2018)。ICKは以前に我々が原因遺伝子として報告したFFHC1と同様に、細胞分裂時の微小管生成、細胞増殖に関わることから、共通のメカニズムを通しててんかんを引き起こしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is the most frequent epilepsy. In this study, we identified ICK (intestinal cell kinase) as the gene responsible for JME, the disease mutations interfere neuronal migration, and Ick knockout mouse showed an increased seizure susceptibility to isoflurane (Bailey et al, New Eng J Med 378:1018-28, 2018). Similarly to the EFHC1 that we previously reported as a JME gene, ICK also play roles in microtubule regulation and neural cell migration suggesting an overlapping pathomechanism for JME.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：てんかん 遺伝子 若年ミオクロニーてんかん

## 1. 研究開始当初の背景

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期(8~20歳)に発症し、ミオクロニー発作、強直間代発作などを特徴とする最も頻度の高い特発性てんかん(てんかん発作のみを症状とし、脳内病変を特定することが出来ない機能性てんかん)の一つである。申請者らは以前、遺伝的連鎖解析などにより候補領域を染色体領域 6p21 に絞り込み、当該領域の新規遺伝子 EFHC1 から家系内で連鎖を示す 5 種類のミスセンス変異を 6 家系で見いだし原因遺伝子の一つとして報告した (Suzuki et al., Nature Genetics, 36:842-9, 2004)。その後、我々 (Medina et al., Neurology, 70:2137-44, 2008) 及び他の複数の研究チーム (Ma et al., Epilepsy Res 71:129-34, 2006; Annesi et al., Epilepsia 48:1686-90, 2006; Stogmann et al., Neurology 67:2029-31, 2007) により更に多くの EFHC1 変異が、JME ばかりでなく若年性欠神てんかんや潜因性の側頭葉てんかん、非分類の特発性全般てんかんなどでも報告されている。また、我々が以前に JME 患者においてヘテロ接合疾患変異として報告した F229L (Suzuki et al., Nature Genetics, 2004) のホモ接合変異がエクソーム配列解析とホモ接合領域解析により早期 (生後 18-36 ヶ月) に死亡する難治てんかん家系内の 3 名の患者において見いだされた (Berger et al., Epilepsia 53:1436-40, 2012)。この発見は、EFHC1 遺伝子変異が特発性てんかんである JME のみならず、重篤な難治てんかんでも役割を果たしていることを示す。更にはヘテロ接合に於ける JME での浸透率が 60~70% と想定される本 F229L 変異の一般集団に於ける出現確率が 1/143 と比較的高いことも (Berger et al., 2012) EFHC1 変異を介したてんかんの理解の重要性を高めていると言える。我々は、myoclonin1 が胎生期には脳室内の脈絡叢の細胞で、出生後は気管や脳室

の内壁を覆う細胞の繊毛で多く発現がみられる事も報告している (Suzuki et al., Biochem Biophys Res Com, 367:226-33, 2008)。更に我々は、Efhc1 遺伝子改変マウスを作製・解析し、遺伝子改変マウス (ヘテロおよびホモ接合体) の性成熟期以降において自然誘発的なミオクローヌス発作が野生型と比べ 7~8 倍多く出現すること、このミオクローヌス発作出現時に異常な活動電位が脳波に出現すること、痙攣誘発剤の一つペンチレンテトラゾル (PTZ) に対し高い感受性を示すことなど、てんかん患者と類似の症状を示すことを発見し、Efhc1 の欠損がてんかんを引き起こす直接的な生物学的証拠として示すとともに、遺伝子改変マウスでの脳室壁上衣細胞繊毛の運動機能低下や脳室拡大などいくつかの特異的な異常症状を示すことも明らかにし、併せて報告した (Suzuki et al., Hum Mol Genet 18:1099-109, 2009)。しかしながら、Myoclonin1 変異が引き起こす上衣細胞の機能異常がいかんしててんかん発症につながるのか、その分子カスケードはいまだ明らかではない。最近我々は酸化ストレスに反応して細胞死を誘導する TRPM2 チャンルに myoclonin1 が結合しその活性を制御することを報告した (Katano et al., Cell Calcium, 51:179-85, 2012)。これらの相互作用が、上位細胞の繊毛運動やその他の機能とどう関わるのか、更にそれらとてんかん発症との関わり の 解 明 が 有 効 な 治 療 法 の 開 発 の 観 点 から も 非 常 に 重 要 で あ る 。

## 2. 研究の目的

新たな JME 原因遺伝子の同定、当該遺伝子および以前に同定した EFHC1 遺伝子変異に基づく (共通する) 若年ミオクロニーてんかん発症機構の解明、遺伝子導入による治療法開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

多くの JME 家系の全エクソーム解析などの大規模遺伝学解析、原因遺伝子がコードするタンパクの機能解析、当該遺伝子ノックアウトマウスについての、てんかん発症、てんかん誘発剤に対する感受性亢進の有無などの検証、コードされるタンパクの機能解析、変異の機能へ及ぼす効果の解析、以前報告した Efhc1 遺伝子改変マウス(Suzuki et al., **Hum Mol Genet** 18:1099-109,2009)に正常 Efhc1 遺伝子を導入による治療法開発、マウスにおいて EFHC1 と結合する受容体の結合部位に相同な配列を持つペプチドの導入により阻害し、上皮細胞の繊毛運動その他の機能への影響の有無の検討。

### 4. 研究成果

JME 大家系の全ゲノムエクソーム解析と相関解析、334 家系での候補遺伝子解析などにより、原因遺伝子が存在する染色体候補領域を 6 番染色体 p12 領域に絞り込み、そこに存在し腸管細胞キナーゼをコードする ICK 遺伝子に複数の疾患変異を発見した。それら変異は JME 患者のおよそ 7%に見いだされた。さらに、これらの変異が神経前駆細胞の移動を阻害すること、Ick 欠損マウスがイソフルラン（吸入麻酔薬）による麻酔の傾眠時に強直間代発作を引き起こすことなどを明らかにし、論文報告した（Bailey et al, **New Eng J Med** 378:1018-28, 2018）。腸管細胞キナーゼは、キネシンスーパーファミリータンパク質 Kif3a や細胞内シグナル伝達に關与するキナーゼの一種である mTOR 制御タンパク質 Raptor のリン酸化などを通して、細胞分裂時の微小管生成、細胞増殖に関わることが知られている。また、JME 患者の脳内では大脳皮質前部などにおいて微小異形成と呼ばれる異常な組織学的変化が共通してみられることが知られている。EFHC1 がコードするミオクロニン 1 も同様に、微小管を介した繊

毛や神経細胞増殖・分化・細胞死に関わる機能を持つ。このことから、これら遺伝子の異常が共通のメカニズムを通して、患者脳で見られる「微小異形成」やてんかん発症を引き起こしていると考えられた。また、第 3 の原因遺伝子 myoclonin3 を同定し、さらにそのノックアウトマウスがてんかん表現型を示すことを確認した（論文準備中）。遺伝子導入による治療の試みについては、出生後の Efhc1 ノックアウトマウスの脳室に発現コンストラクトを保持するアデノ随伴ウイルス粒子を注入することにより正常 Efhc1 遺伝子を脳室壁上皮細胞にて効率良く発現させる手法を確立することに成功した。治療効果の検証、手法の最適化については次課題に継承。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Bailey JN+, de Nijis L+, Bai D+, Suzuki T+, Miyamoto H, Tanaka M, Patterson C, Lin YC, Medina M, Alonso M, Seratossa J, Duron R, Nguyen V, Wight J, Martinez-Juarez I, Ochoa A, Jara-Prado A, Guilhoto L, Molina Y, Yacubian E, Lopez-Ruiz M, Inoue Y, Kaneko S, Hirose S, Osawa M, Oguni H, Fujimoto S, Grisar T, Stern J, Yamakawa K\*, Laykaye B\*, Delgado-Escueta A\* (+co-first authors, \*co-corresponding authors). (2018) Variant intestinal cell kinase in juvenile myoclonic epilepsy. **New Eng J Med** Mar 15; 378:1018-28. DOI: 10.1056/NEJMoa1700175. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 2016/10/8 日本てんかん学会（静岡）

教育講演 2「JME の遺伝学」山川和弘

2. 2015/10/7 17:00 静岡てんかんセンター：てんかんシンポジウム「てんかん原因遺伝子の同定：根本治療法の開発を目指して」山川和弘

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180315\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180315_1/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山川 和弘 (YAMAKAWA, Kazuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：30241235

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

鈴木 俊光 (SUZUKI, Toshimitsu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員